

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 juin 2001 (21.06.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/44809 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷:
G01N 33/53, C12Q 1/68

Manuel [IT/FR]; 49, rue Félix Faure, F-91270 Villejuif-sur-Seine (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/03503

(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine,
F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international:
13 décembre 2000 (13.12.2000)

(81) États désignés (national): JP, US.

(25) Langue de dépôt: français

(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, TR).

(26) Langue de publication: français

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

(30) Données relatives à la priorité:
99/15884 16 décembre 1999 (16.12.1999) FR

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): NAUTILUS BIOTECH [FR/FR]; Pépinière Génopole Industries, 4, rue Pierre Fontaine, F-91000 Evry Cedex (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement): VEGA,



WO 01/44809 A2

(54) Title: METHODS FOR SCREENING OR EVALUATING THE PERFORMANCE OF A SET OF BIOLOGICAL AGENTS IN LIVING TARGET CELLS AND THEIR USES

(54) Titre: METHODES DE CRIBLAGE OU D'EVALUATION DE LA PERFORMANCE D'UN ENSEMBLE D'AGENTS BIOLOGIQUES DANS DES CELLULES CIBLES VIVANTES ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns a method for screening and/or evaluating the performance of a set of biological agents, such as a library of recombinant viral or non-viral vectors, of recombinant proteins or antibodies in living target cells (complex biological system).

(57) Abrégé: Méthode de criblage et/ou d'évaluation de la performance d'un ensemble d'agents biologiques, tel qu'une banque de vecteurs viraux ou non viraux recombinants, de protéines recombinantes ou d'anticorps, dans des cellules cibles vivantes (système biologique complexe).

METHODES DE CRIBLAGE OU D'EVALUATION DE LA PERFORMANCE D'UN ENSEMBLE D'AGENTS BIOLOGIQUES DANS DES CELLULES CIBLES VIVANTES ET LEURS APPLICATIONS

L'invention est relative à des méthodes de criblage et/ou
5 d'évaluation de la performance d'un ensemble d'agents biologiques, tels qu'une banque de vecteurs viraux ou non viraux recombinants (vecteurs de transfert de gènes), de vaccins, de protéines recombinantes ou d'anticorps, dans des cellules cibles vivantes (système biologique complexe).

Les progrès relatifs aux transferts de gènes en thérapie génique
10 dépendent de la capacité à développer des vecteurs permettant l'expression d'une substance au niveau de la cellule cible, ladite substance ayant effectivement un effet thérapeutique au niveau de ladite cible. Il est donc important de pouvoir disposer de vecteurs de qualité clinique, utilisables dans des essais de phase I.

Pour l'obtention d'une information quantitative concernant les
15 performances potentielles d'un vecteur de transfert de gène, les paramètres d'évaluation proposés dans la littérature sont :

. le titre en particules physiques (*pp*) (Mittereder et al., J. Virol., 1996, 70, 11, 7498-7509 ; Atkinson et al., NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823 ; Kechli et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9, 4, 587-590 ; Nelson et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9,
20 16, 2401-2405), qui représente le contenu total en particules de vecteur ; habituellement ce titre est évalué soit à partir du contenu en acides nucléiques des vecteurs (hybridation des acides nucléiques ou DO₂₆₀ respectivement pour AAV et AdV), soit à partir du contenu en protéines virales (activité RT et contenu en p24, par exemple pour MLV et HIV, respectivement) ; la mesure physique des particules virales ou des
25 génomes présente l'inconvénient de pouvoir être confondue avec la présence de particules défectives (*defective-interfering particles ou DI*) et

. le titre en particules infectieuses (*ip* : unités infectieuses, unités de transduction) (Mittereder et al., précité ; Weitzman. et al., J. Virol., 1996, 70, 3, 1845-1854 ; Salvetti et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9, 5, 695-706) est évalué par l'étude des
30 changements observés dans les cellules infectées (réPLICATION virale, intégration du provirus, lyse cellulaire, expression du transgène), par des méthodes essentiellement basées sur les dilutions en série, suivies soit par une extrapolation linéaire, soit par une

approximation asymptotique ; ainsi *ip* mesure le nombre de particules actives dans le processus dont l'effet est mesuré : *ip* ne correspond donc pas à toutes les particules potentiellement actives ; *ip* constitue une partie des particules physiques (*pp*), l'autre partie desdites particules physiques étant constituée par des particules inactives (*nip* ou *non-infectious particles*),

la détection des plaques, dans le cas de virus lytiques ; cette méthode est quantitative mais difficile à mettre en œuvre et ne peut pas s'appliquer aux virus non-cytopathiques et

la variation des rapports particules/infectivité.

Par exemple, dans l'article au nom d'E.M. Atkinson et al. (NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823) et dans la Demande Internationale PCT WO 99/11764, pour résoudre le problème de la détermination du titre et la comparaison de différents virus recombinants utilisés en thérapie génique, il est proposé une nouvelle méthode, considérée comme plus fiable que celles antérieurement utilisées et qui met en œuvre essentiellement une étape d'amplification du matériel génétique viral dans une lignée cellulaire hôte, des préparations de vecteur standard de titre connu obtenues par dilutions en série et un contrôle interne de titre connu. De manière plus précise, la méthode comprend dans différents puits d'une plaque de microtitration, l'infection de cellules à l'aide d'une préparation virale, la réPLICATION du génome viral dans ladite cellule hôte, la lyse chimique de ladite cellule, une hybridation de l'acide nucléique puis la détermination de la quantité relative d'acide nucléique viral répliqué dans chaque puits.

Dans l'article au nom d'A.R. DAVIS et al. (Gene Therapy, 1998, 5, 1148-1152), il est considéré qu'une utilisation optimale des adénovirus recombinants en thérapie génique passe par le développement d'une technique adaptée à la séparation rapide de nouveaux recombinants qui ne sont pas contaminés par le virus sauvage. Pour ce faire, les Auteurs de cet article proposent de créer des adénovirus recombinants en cotransfектant des cellules 293 avec l'ADN viral dérivé à partir de la région 3' du génome d'un recombinant qui ne comprend pas la région E1 mais qui exprime la protéine fluorescente (GFP ou *green fluorescent protein*) et un plasmide portant la région 5' du génome ; la cotransfection peut ainsi être visualisée par microscopie de fluorescence.

Les méthodes de l'art antérieur font appel exclusivement à la mesure du titre en particules physiques (*pp*) et/ou à la mesure du titre en particules infectieuses (*ip*) pour évaluer un vecteur de transfert de gène. Les préparations de vecteur avec un titre élevé en particules infectieuses et un rapport particules physiques/particules infectieuses faible sont considérées comme étant de haute qualité, ces deux paramètres étant considérés comme fournissant une information quantitative concernant la performance d'un vecteur de transfert de gène.

Toutefois, les procédures actuelles utilisées pour évaluer *pp* ainsi que *ip* varient selon le type de vecteur, sont peu reproductibles et imprécises ; en outre, ces paramètres ne sont pas suffisamment informatifs pour permettre de définir de manière précise les caractéristiques d'un vecteur et donc d'évaluer ses performances.

La présente invention s'est en conséquence donnée pour but, de fournir un procédé standardisé qui soit apte à évaluer l'interaction entre un vecteur de thérapie génique et plus généralement de n'importe quel agent biologique, avec un système biologique complexe (cellules cibles vivantes).

C'est également un but de l'invention de fournir un procédé de criblage d'un ensemble d'agents biologiques complexes, en vue de la sélection de l'agent biologique le plus adapté à l'application recherchée.

La présente invention a pour objet un procédé d'évaluation de la performance d'un ensemble d'agents biologiques complexes dans des cellules cibles vivantes, avec lesquelles lesdits agents biologiques interagissent, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

(a) la préparation, pour chaque agent biologique dudit ensemble, d'une gamme d'échantillons, obtenue par dilutions en série dudit agent biologique à une concentration R1,

(b) l'incubation de chaque échantillon de ladite gamme de dilutions obtenue en 1. avec lesdites cellules cibles à une concentration constante R2,

(c) la détermination du produit P de la réaction R1 + R2, à un instant t, dans chacun desdits échantillons,

(d) l'établissement d'une courbe théorique H à partir desdits points expérimentaux R1 et P, pour chaque agent biologique par approximation itérative de

paramètres qui reflètent la réaction $R1+R2 \rightarrow P$, audit instant t, conformément à l'équation suivante :

$$P = P_{\max} (\pi R1)^r / (\kappa + (\pi R1)^r) \quad r=1, \dots, n \quad (2),$$

dans laquelle :

5 R1 représente la concentration en agent biologique dans un échantillon de la gamme,

P représente le produit de la réaction R1 + R2 à un instant t,

P_{\max} représente la capacité maximale de la réaction,

10 κ représente la résistance du système biologique à une concentration constante R2 à répondre audit agent biologique (constance de résistance de R2),

r représente un coefficient qui dépend de R1 et qui correspond au coefficient de Hill, et

π représente la puissance intrinsèque de l'agent biologique R1 à induire une réponse dans le système biologique (production de P à l'instant t), et

15 (e) le tri des valeurs de κ et de π obtenues en (d), pour chaque agent biologique et le classement des agents biologiques en fonction desdites valeurs.

La présente invention a également pour objet un procédé de criblage d'un ensemble d'agents biologiques complexes modifiés (banque de mutants) dans des cellules cibles vivantes avec lesquelles lesdits agents biologiques interagissent, 20 lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes (a) à (e) telles que définies ci-dessus et une étape (f) de sélection de l'agent biologique le plus adapté à l'application recherchée.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, l'ensemble d'agents biologiques modifiés est constitué par une banque de mutants, 25 obtenue par l'introduction naturelle ou artificielle d'une ou plusieurs mutations dans la séquence nucléotidique et/ou peptidique desdits agents biologiques.

Au sens de la présente invention, on entend par mutation, une insertion, une délétion ou une substitution d'au moins un nucléotide ou d'au moins acide aminé.

30 Les procédés selon l'invention consistent à analyser pour chaque gamme d'agent biologique à tester, sur la base de l'équation de Hill, la réponse du système biologique (production d'un produit P à un instant t).

L'équation de Hill est une formalisation générale qui décrit l'interaction entre différentes molécules. Elle exprime la quantité de produit formé comme une fonction de la concentration des réactifs et de la constante d'affinité du système.

5 Originellement développée pour l'étude de la dissociation entre l'hémoglobine et l'oxygène, l'équation de Hill englobe l'analyse de la cinétique enzymatique par l'équation de Michaelis-Menten, l'analyse de la liaison ligand-récepteur et l'analyse des systèmes allostériques.

En effet, conformément à Hill, pour une réaction simple :



dans laquelle l'affinité K entre R1 et R2 change en fonction de leurs concentrations ; l'équation de Hill décrit l'accumulation du produit P comme une fonction de la concentration de l'un des réactifs (R1) et des propriétés intrinsèques (K) 15 du système.

$$P = \sum_{r=1}^{r=n} P_{\max} \cdot R_1^r / (K + R_1)^r \quad (R_2 \text{ constante}) \quad (1)$$

dans laquelle R1, P, P_{\max} et K représentent respectivement la 20 concentration du réactif R1, la concentration du produit P, la capacité maximale de la réaction et la constante d'affinité entre R1 et R2.

Le coefficient de Hill r est une fonction de R1. r est égal à 1 lorsque des sites de liaison interactifs indépendants sont impliqués entre R1 et R2, comme dans le cas décrit par Michaelis-Menten. r varie de 1 à n pour des systèmes dans les 25 lesquels les sites impliqués dans l'interaction entre R1 et R2 ne sont pas indépendants les uns des autres. L'affinité pour R1 au niveau de nimporte quel site de liaison de R2 varie comme une fonction soit du degré d'occupation des autres sites de R2, soit de la concentration de R1 lui-même ou soit de la concentration d'autres régulateurs (positifs ou négatifs).

30 Ces analyses basées sur l'équation de Hill se sont toujours limitées à des protéines individuelles ou à des systèmes simples mis en œuvre dans des conditions expérimentales définies de manière très précise.

Il n'était pas pensable, jusqu'à présent que l'équation de Hill pouvait s'appliquer à l'interaction entre des systèmes complexes telles que les cellules vivantes et des agents biologiques complexes tels que les virus, les vecteurs viraux et non-viraux recombinants comme les vecteurs de transfert de gènes, les vaccins, les protéines recombinantes ou les anticorps, par exemple.

De manière surprenante, l'Inventeur a maintenant trouvé que l'analyse de systèmes complexes tels que l'infection d'une cellule par un virus ou un vecteur de thérapie génique, était possible par sélection de paramètres directement dérivés de l'équation de Hill.

10 **Premières définitions**

- R1 correspond à la concentration en agent biologique ; il peut signifier, dans la présente invention, selon le contexte, l'ensemble des concentrations obtenues par dilution de la préparation d'agent biologique, utilisées pour déterminer le produit P ou l'agent biologique lui-même ;

15 - on entend par agent biologique, par exemple, mais de manière non limitative, un vecteur viral ou non viral recombinant contenant une molécule d'acide nucléique d'intérêt (gène, cassette d'expression d'une protéine, molécule d'ARN antisens, ribozyme, génome viral recombinant ou fragment de ce génome) tel qu'un vecteur de transfert de gènes ou un vecteur d'expression, un virus, un anticorps, un 20 vaccin ou une protéine recombinante ;

- R2 correspond à la concentration des cellules cibles vivantes, il peut signifier, dans la présente invention, selon le contexte, la concentration des cellules cibles vivante (constante) utilisée pour déterminer le produit P ou les cellules cibles vivantes elles-mêmes ;

25 - on entend par cellules cibles vivantes, des cellules cibles *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*, avant leur modification par un agent biologique ;

- P (*output*) représente la réponse des cellules cibles R2 à chaque dilution d'agent biologique (*input*) à une concentration R1 ; le produit P peut être déterminé soit directement, soit indirectement par la mesure de paramètres biologiques reflétant la réponse du système biologique (cellules cibles) audit agent biologique (ou réaction R1+R2 ou processus biologique) ; il s'agit notamment de la mesure d'une activité enzymatique, de l'expression d'un transgène, de la productivité d'un

virus, de la cytotoxicité, de la tumorigénèse, de l'immunogénicité etc..... Dans ce cas, le test biologique mis en œuvre pour déterminer P est soit un test *in vitro*, soit un test *in vivo*; il permet de déterminer des paramètres biologiques représentatifs de la réponse du système biologique à l'agent biologique étudié ;

5 - les techniques utilisées pour déterminer, estimer, analyser ou calculer les valeurs de P à un instant t sont, de manière non limitative, des mesures de radioactivité, de fluorescence, de luminescence, d'absorbance ou le dénombrement de cellules ;

- le paramètre π : π mesure la puissance intrinsèque de l'agent biologique pour produire P dans les cellules cibles vivantes considérées ; π s'oppose à κ (constante de résistance) qui constitue le facteur d'opposition desdites cellules à la production de P ; par exemple, dans le cas où l'agent biologique est représenté par des particules virales infectieuses (R1), l'on peut considérer que pour chaque particule virale infectieuse ajoutée, l'activité du virus est donnée par l'équation $\pi R1$; pour 10 obtenir une réponse des cellules cibles vivantes (production de P), la puissance intrinsèque π doit être supérieure à κ dans la cellule. π constitue une caractéristique spécifique de l'agent biologique étudié ; dans ce contexte, des variants d'un agent biologique étudié ne présenteront pas la même valeur de π dans un processus réactionnel donné. On peut considérer que π constitue un paramètre reflétant l'activité chimique 15 pour opposition à la concentration pour des composés chimiques simples. π constitue un facteur de correction qui affecte la concentration R1 de l'agent biologique pour indiquer sa force ou activité réelle dans un processus réactionnel donné ; les variations de π affectent l'équation (2) en déplaçant la courbe vers la droite ou vers la gauche selon que la valeur de π décroît ou croît ; la pente de la courbe obtenue à l'étape (d) 20 augmente, lorsque π augmente ; les courbes obtenues à l'étape (d), qui ne diffèrent entre elles qu'en ce qui concerne le paramètre π , ne sont pas parallèles entre elles ; π est un paramètre clé pour la caractérisation de l'agent biologique et la détermination de sa performance pour accomplir la réaction (processus biologique) étudiée : π trouve 25 une application directe et pratique dans l'optimisation et la mise au point de l'agent biologique utilisé, dans la mesure où ce paramètre permet de comparer la puissance 30

relative de variants dudit agent ; toutefois, ce paramètre ne permet pas seul d'évaluer l'ensemble du système ;

- le paramètre κ (constante de résistance) : κ mesure la résistance interne des cellules cibles vivantes au processus biologique induit par l'agent biologique pour l'obtention de P ; κ est une caractéristique spécifique du processus biologique (réaction entre R1 et R2) particulier et des cellules cibles vivantes (type cellulaire) testées : le même processus biologique pour des lignées ou des types cellulaires différents conduira à l'obtention de paramètres κ différents ; de plus, les facteurs qui ont une influence sur la performance d'une cellule dans la réalisation dudit processus biologique, tels que les agents contaminants ou les agents toxiques, modifient la valeur de κ pour ladite cellule ; on peut considérer que κ est analogue aux constantes de dissociation ou d'affinité pour des composés chimiques ou des réactions biologiques simples ; les variations de κ affectent l'équation (2) en déplaçant la courbe de la droite vers la gauche, selon que κ augmente ou diminue ; les courbes obtenues à l'étape (d), qui ne diffèrent entre elles qu'en ce qui concerne le paramètre κ , sont parallèles entre elles ; κ est un paramètre clé pour l'estimation des performances du test biologique sélectionné pour évaluer la réaction globale (réaction R1+R2) ; κ trouve une application directe et pratique dans le développement et la validation du test sélectionné pour évaluer la réaction dans laquelle intervient l'agent biologique et dans l'évaluation de la susceptibilité ou la sensibilité de différents types cellulaires à participer à ladite réaction.

De manière surprenante, conformément au procédé selon l'invention, différents agents biologiques complexes et/ou différentes cellules cibles vivantes peuvent être comparés et classés sur la base de leur performance évaluée par au moins les deux paramètres ci-dessus mentionnés, désignés par l'expression « paramètres de Hill ».

Ainsi une analyse précise et une comparaison de la réponse biologique des cellules cibles vivantes tant *in vitro* qu'*in vivo* à des agents biologiques complexes devient effectivement possible.

Également conformément à l'invention un certain nombre de paramètres, dérivés de l'équation de Hill, peut être enregistré et utilisé pour quantifier des

caractéristiques pertinentes d'un système complexe : agent biologique, cellules cibles et processus ou réaction, résultant de leur interaction.

Par exemple, dans le cas où le système complexe serait représenté par l'infection d'une cellule par un virus, on peut observer un grand nombre 5 d'interactions (protéine/protéine, protéine/acide nucléique, protéine/petite molécule), qui sont susceptibles d'être, conformément à l'invention, décrites par le procédé mettant en œuvre l'équation de Hill. La réaction globale, formalisée par les réactifs entrants (*input*), à savoir les virus et les cellules et les produits de la réaction (*output*) [réponse cellulaire à l'infection] peut être analysée en utilisant l'équation de Hill, et 10 ce, quel que soit le nombre d'étapes intermédiaires.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux desdits procédés, l'agent biologique est sélectionné dans le groupe constitué par les virus, les vecteurs viraux et non-viraux, les vaccins, les anticorps et les protéines recombinantes.

Des réactions complexes, telles que celles impliquant l'interaction 15 entre des virus recombinants (R1) et des cellules vivantes (R2) et qui induisent une réponse biologique, peuvent être analysées et les réactifs (R1 et R2) caractérisés par le procédé selon l'invention mettant en œuvre l'équation de Hill (paramètres π et κ) et éventuellement au moins l'un des paramètres dérivés, tels que définis ci-après.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux desdits procédés, 20 à l'étape (c), la détermination de P est réalisée soit de manière directe, par exemple par dosage de P, soit de manière indirecte, par exemple, à l'aide d'un test biologique convenablement sélectionné pour la mesure d'au moins un paramètre ou une variable reflétant la réponse des cellules cibles vivantes audit agent biologique, comme précisé ci-dessus.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux desdits procédés, 25 ils comprennent, en outre, la mesure d'au moins l'un des paramètres dérivés suivants :

- l'efficacité globale ϵ de la réaction induite par l'agent biologique sur ledit système,
- le titre apparent τ de l'agent biologique,
- le titre absolu θ dudit agent biologique, et
- l'index d'hétérogénéité η de ladite réaction biologique.

Définitions de ces paramètres dérivés

- efficacité globale ϵ : ϵ mesure l'efficacité globale maximale de la réaction agent biologique (R1), caractérisé par un paramètre π donné et des cellules cibles vivantes (R2), caractérisées par un paramètre κ donné : ϵ est donc spécifique du couple agent biologique (π)/système biologique (κ) pour ce qui concerne la réaction étudiée ; des modifications des paramètres π et/ou κ entraînent des modifications du paramètre ϵ . ϵ est un paramètre clé pour la caractérisation de l'efficacité de la réaction globale mettant en œuvre R1 et R2 ; il est en particulier important et utile pour l'optimisation du *test* lorsque π et κ ont été sélectionnés et pour étudier de manière séparée les modifications soit de π , soit de κ ;
- le titre apparent τ : dans l'équation de Hill (2), lorsque R1 augmente, r augmente de 1 à 2, 3, 4 et P approche sa valeur maximale P_{max} . Dans l'autre direction, R1 ne peut diminuer que jusqu'à un point minimal ($R1_{min}$), auquel correspondent les valeurs minimales de r et de P. La courbe sigmoïdale de Hill n'est pas symétrique : seul son bras droit est asymptotique (jusqu'à P_{max}) ; sur son bras gauche, la courbe a une origine à $R1_{min}$. D'un point de vue biologique, le fait qu'il n'existe pas de P pour $R1 < R1_{min}$, signifie qu'il n'y a pas de produit de réaction lorsque la concentration en agent biologique est $< R1_{min}$: le système ne répond pas à des valeurs de $R1 < R1_{min}$. $R1_{min}$ représente donc la quantité minimale de R1 qui induit une réponse dans les cellules cibles vivantes concernées et est représenté par τ ; le titre, défini de cette manière, ne correspond ni à une valeur asymptotique, ni à une valeur approchée par extrapolation, mais un paramètre précis de l'équation de Hill et correspond à l'origine mathématique de la courbe théorique obtenue en (d). On peut donc considérer que τ mesure la dilution limite ou le titre apparent de l'agent biologique étudié ; la valeur de τ est déterminée par la limite de sensibilité du système et par la méthode utilisée pour mesurer le produit P ; c'est la raison pour laquelle il est dénommé titre apparent ; τ est spécifique de la quantité d'agent biologique testé et représente la concentration apparente de l'agent biologique ; il est exprimé en unités par volume (dilution maximale d'agent biologique qui induit la production de P). En d'autres termes, τ est représenté par le R1 maximal pour lequel le coefficient de Hill r atteint sa valeur minimale, ledit coefficient de Hill devenant constant pour une valeur

égale à ou proche de 1. τ selon la présente invention, correspond au titre généralement utilisé pour les virus, les anticorps et les vecteurs ; toutefois, contrairement à ce qui est décrit dans l'art antérieur, ce paramètre seul ne permet pas d'évaluer un système biologique complexe. Les variations de τ affectent l'équation (2) en déplaçant la courbe vers la droite ou vers la gauche, selon que la valeur de τ décroît ou croît, respectivement. τ constitue un paramètre clé qui mesure la concentration apparente du stock initial d'agent biologique, qui est nécessaire à l'usage que l'on souhaite en faire :

- titre absolu θ : θ mesure le titre absolu en agent biologique ; la valeur de θ n'est ni déterminée, ni dépendante de la limite de sensibilité des cellules cibles testées ou de la méthode utilisée pour mesurer P ; c'est la raison pour laquelle θ est dénommé titre absolu ; θ est spécifique de la quantité initiale d'agent biologique testé ; il représente la concentration physique réelle en agent biologique et est exprimé en unités/volume (i. e. la dilution maximale d'agent biologique qui induit la production de P) ; θ est obtenu, conformément à l'équation (3) suivante :

$$\theta \pi = \tau / s \quad (3),$$

dans laquelle s représente la sensibilité de la méthode de détection.

En conséquence, pour des agents biologiques évalués en utilisant la même méthode de détection de P , l'expression suivante, représentée dans l'équation (4) suivante est valable :

$$\theta_1 \pi_1 / \tau_1 = \theta_2 \pi_2 / \tau_2 = \theta_n \pi_n / \tau_n = \text{constante} \quad (4).$$

En utilisant l'équation (4), le rapport entre deux titres absolus correspondant à deux préparations d'agents biologiques différents, peut être obtenu à partir des valeurs de π et de τ de ces deux préparations d'agents biologiques. Les variations de θ affectent l'équation (2) en déplaçant la courbe vers la droite ou vers la gauche et/ou en changeant la pente de la courbe. θ est le paramètre qui mesure la concentration absolue initiale en agent biologique.

- l'index d'hétérogénéité η : η mesure l'hétérogénéité interne de la réaction qui peut être due, soit aux cellules (discontinuité de la constante de résistance κ), soit à l'agent biologique (discontinuité de la puissance intrinsèque π). La présence d'une hétérogénéité interne dans la réaction R1+R2 peut être détectée par l'apparition

de paliers dans l'évolution du coefficient de Hill, correspondant à la courbe de Hill qui s'ajuste aux données expérimentales. η est donc défini comme l'index d'hétérogénéité et sa valeur correspond au nombre de paliers observés dans l'évolution du coefficient de Hill : un palier : $\eta = 1$; deux paliers : $\eta = 2$; trois paliers : $\eta = 3$; n paliers : $\eta = n$.

5 η est un paramètre clé pour l'analyse détaillée de la réaction. Il est utile pour l'étude de chaque palier identifié. La présence de paliers se traduit par une discontinuité brusque de κ ou de π . Les processus complexes, tels que ceux évalués dans la présente invention, consistent en une succession d'événements dans un réseau multidimensionnel de réactions biologiques reliées entre elles et interrégulées. Ainsi,

10 la constante de résistance κ pour une réaction particulière est un indicateur macroscopique de la résistance globale de la réaction biologique ($\kappa = \kappa_1 \times \kappa_2 \times \kappa_i \dots \kappa_n$). Si la contribution des constantes microscopiques de résistance ($\kappa_1, \kappa_2, \dots \kappa_i, \dots \kappa_n$) pour les paliers individuels impliqués dans la réaction étaient homogènes, et qu'aucun seuil n'existe pour passer d'un palier à l'autre ; dans ce cas, on n'observerait aucune

15 discontinuité dans l'évolution du coefficient de Hill par rapport à R1. Cependant, l'existence d'une hétérogénéité importante parmi les valeurs κ_i correspondant aux paliers individuels microscopiques pourrait conduire à une discontinuité macroscopique du système. Cette hétérogénéité pourrait entraîner des modifications dans la variation du coefficient de Hill et en conséquence, le besoin d'un saut quantitatif des

20 valeurs macroscopiques de κ afin que l'équation (2) s'ajuste aux données. .

En conséquence, chaque palier peut-être déterminé par une constante de résistance macroscopique κ différente et/ou une constante de résistance macroscopique π différente. Les systèmes dans lesquels $\eta = 2$ peuvent ainsi être décrits à l'aide d'une équation de Hill dans laquelle :

25 - κ prend deux valeurs différentes : κ_1 et κ_2 , selon les valeurs de R1 considérées : une partie de la courbe est décrite par κ_1 et une autre partie de la courbe est décrite par κ_2 . Les courbes de Hill décrivant la réaction globale, caractérisées par $\eta = 2$ sont des hybrides générées à partir de deux courbes de Hill parallèles différant uniquement par le paramètre κ . La transition d'une courbe à l'autre peut modifier la

30 pente de la courbe de Hill résultante ou

- π prend deux valeurs différentes : π_1 et π_2 , selon les valeurs de R_1 considérées : une partie de la courbe est décrite par π_1 et une autre partie de la courbe est décrite par π_2 . Les courbes de Hill décrivant la réaction globale, caractérisées par $\eta = 2$ sont des hybrides générées à partir de deux courbes de Hill parallèles différant 5 uniquement par le paramètre π . La transition d'une courbe à l'autre peut modifier la pente de la courbe de Hill résultante.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux desdits procédés, la mesure du paramètre d'évaluation ϵ représentant l'efficacité spécifique d'un agent biologique apte à induire la production de P dans lesdites cellules cibles vivantes est 10 réalisée :

- soit par mesure de la pente, de la courbe H théorique obtenue en (d), à son point d'inflexion,
- soit par calcul du maximum de la dérivée première $\delta P/\delta R_1$ et éventuellement de la dérivée seconde de la courbe théorique H obtenue en (d) ; en 15 effet, l'efficacité de la réaction décrite dans l'équation (2) est donnée par l'augmentation de l'*output* P qui peut être obtenue en augmentant l'*input* R_1 . Ainsi, la dérivée première de P par rapport à R_1 , ou la pente de la courbe décrite dans l'équation (2) fournit l'efficacité globale de la réaction pour chaque *input* ou entrée R_1 .

20 L'efficacité globale maximale ou ϵ est donc bien exprimée directement soit par la pente au point d'inflexion de la courbe décrite dans l'équation (2), soit par le maximum de sa dérivée $\delta P/\delta R_1$. A la fois la pente de la courbe donnée par l'équation (2) et le maximum de $\delta P/\delta R_1$ augmentent lorsque ϵ augmente.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux desdits procédés, 25 ils comprennent, en outre, la mesure des paramètres suivants : π/P_{max} , κ/P_{max} ou ϵ/P_{max} . Ces valeurs corrigées sont indépendantes de la capacité maximale(P_{max}), elles permettent donc de mieux comparer les différents paramètres, π , κ et ϵ dans le cas où P_{max} serait différente selon les systèmes ou bien dans le cas où l'agent biologique affecterait P_{max} .

Selon encore un autre mode de mise en œuvre desdits procédés, les valeurs des paramètres de Hill correspondant à chaque agent biologique sont comparées à celles obtenues avec un agent biologique de référence.

Également conformément à l'invention, pour valider l'analyse de la réaction R1+R2 par l'équation de Hill, lesdits procédés peuvent comprendre en outre une étape de traitement des données expérimentales obtenues à l'étape (d) (*Hill plot*), conformément à l'équation suivante :

$$\log | P/(1 - P) | \text{ vs. } \log R_1.$$

Également conformément à l'invention, la sélection des agents biologiques, des vecteurs par exemple, présentant des valeurs minimales acceptables pour les paramètres sélectionnés : κ , r , ε , θ , τ , η , π/P_{\max} , κ/P_{\max} ou ε/P_{\max} peuvent avantageusement être soumis à une analyse itérative pour obtenir la courbe H la mieux ajustée statistiquement aux valeurs expérimentales R1 et P.

Les agents biologiques, sélectionnés, conformément aux procédés selon l'invention sont ensuite validés définitivement pour leurs propriétés biologiques.

De manière avantageuse, les paramètres κ , r , ε , θ , τ , η , π/P_{\max} , κ/P_{\max} ou ε/P_{\max} , obtenus conformément aux procédés selon l'invention sont utilisés pour :

- valider et optimiser les agents biologiques utilisables dans une application particulière (procédé de criblage d'une banque d'agents biologiques modifiés),

- développer et optimiser les tests de caractérisation d'agents biologiques, éventuellement modifiés (procédé d'évaluation de la performance).

A titre d'exemple et de façon non limitative, les procédés selon l'invention peuvent être utilisés pour :

- cribler une banque de vecteurs viraux ou non viraux pour la thérapie génique, une banque d'anticorps pour le diagnostic d'une infection ou la sélection d'anticorps efficaces contre des cellules tumorales ou bien une banque de protéines recombinantes pour le diagnostic ou le traitement d'une pathologie humaine ou animale ;

- comparer différents vecteurs ou des lots d'un même vecteur obtenus par un même procédé de préparation ou par des procédés de préparation différents.

En variante, ce sont les cellules cibles qui sont soumises à des dilutions en série, R1 étant constante ; les étapes (a) et (b) sont donc modifiées en conséquence et l'étape (d), comprend l'établissement d'une courbe théorique H la mieux ajustée aux valeurs expérimentales (P et R2) par itération, en attribuant des valeurs aux différents paramètres de l'équation de Hill (P_{max} , κ , π et r).

La présente invention a également pour objet, un agent biologique modifié caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé de criblage selon l'invention.

Outre les dispositions qui précédent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1A représente les courbes théoriques de Hill (H) obtenues par itération à partir des valeurs expérimentales P et R1 ($f(\log dil)$) des deux échantillons 1 et 2 de rAAV. Les paramètres κ , π , r et P_{max} de ces deux échantillons ont été déterminés directement à partir de ces courbes théoriques ;
- 20 - la figure 1B représente la courbe $r = f(\log dil)$ qui permet de déterminer l'index d'hétérogénéité du système biologique (η) ;
- la figure 2 représente le plot de Hill ($\log |P/(1-P)| = f(R1)$) ;
- la figure 3 illustre l'obtention du paramètre ϵ ;
- la figure 4 représente les valeurs expérimentales obtenues (P et R1)
- 25 et l'ensemble des valeurs théoriques calculées qui ont servi au tracé des différentes courbes présentées dans les figures 1 à 3 ;
- la figure 5 représente les valeurs des différents paramètres de Hill obtenues selon l'invention pour les deux échantillons de rAAV étudiés ;
- la figure 6 (A et B) illustre un système biologique hétérogène ($\eta =$
- 30 2). La figure 6A représente les courbes théoriques de Hill s'ajustant aux valeurs expérimentales de P et de R1 ($f(concentration)$) ; la figure 6B comprend en abscisse le n°

du point, ordonné selon les concentrations de la figure 6A et en ordonnées les valeurs de r ; cette courbe présente 2 paliers ($\eta = 2$) ;

- la figure 7 illustre le criblage d'une banque de vecteurs d'expression du gène *rep* de rAAV, chacun des vecteurs codant pour un mutant différent dudit gène. Les courbes expérimentales $P = f(\log 1/\text{dilution})$ sont présentées pour chaque vecteur et la valeur du titre apparent τ , déterminée à partir de chaque courbe théorique de Hill, est indiquée par une flèche sur l'axe des abscisses ;

- la figure 8 illustre l'évaluation de la performance d'un plasmide d'expression par le procédé selon l'invention ; et

10 - la figure 9 illustre le criblage d'une banque d'anticorps par le procédé selon l'invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

15 **Exemple 1 : Comparaison de la performance de deux échantillons de vecteurs recombinants [virus associé à l'adénovirus recombinant (rAAV)] dans des cellules HeLa rc-32.**

a) Matériel et méthode

- Définition du système biologique

20 L'agent biologique étudié est un vecteur viral recombinant (rAAV). Deux stocks de rAAV (échantillon 1 et échantillon 2), obtenus selon les techniques classiques connues de l'homme du métier, décrites dans E.M. Atkinson et al. (NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823) ont été évalués dans les cellules HeLa rc-32 (A. Salvetti et al., Hum. Gene Ther., 1998, 20, 9, 5, 695-706). Les cellules ont été ensemencées dans les puits d'une plaque de microtitration à une concentration R2 constante, puis infectées avec les dilutions en série des échantillons 1 et 2. Au temps $t=48\text{h}$ à 72h , les cellules ont été récoltées puis le génome viral a été isolé et hybridé avec une sonde nucléotidique spécifique marquée, selon la technique du Dot Blot classiquement utilisée par l'homme du métier, décrite dans E.M. Atkinson et al. (NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823). Le signal (produit P) représentant la quantité d'ADN hybride a été mesuré pour chaque dilution des échantillons 1 et 2, à l'aide d'un phosphorimageur et les valeurs obtenues sont présentées dans la figure 4. Le test biologique mis en œuvre

(hybridation) permet d'évaluer la réPLICATION de l'agent biologique (rAAV) dans les cellules cibles HeLa rc-32.

Les étapes suivies, conformément au procédé selon l'invention pour analyser lesdits rAAV sont présentées ci-dessous. L'ensemble des valeurs des différents paramètres de Hill obtenues pour les échantillons 1 et 2 de rAAV est résumé dans la figure 5.

- Etape 1 : Détermination de la courbe de Hill optimale (H) pour chaque préparation de vecteur (figure 1A)

La courbe de Hill optimale s'ajustant le mieux avec les valeurs expérimentales a été obtenue par itération en attribuant des valeurs aux différents paramètres de l'équation de Hill, à savoir : P_{max} , κ , π , et r . Les meilleures courbes de Hill obtenues pour les échantillons 1 et 2 sont présentées sur la figure 1A, elles correspondent respectivement aux valeurs théoriques H1 et H2 des échantillons 1 et 2, (figure 4). Les valeurs de P sont exprimées en unités arbitraires (pixels) en fonction du log de la dilution du vecteur.

Pour l'échantillon 1, on obtient :

$$P = 2,05 (0,125 R1)^r / (450 + (0,125 R1)^r)$$

Pour l'échantillon 2, on obtient :

$$P = 2,35 (0,172 R1)^r / (450 + (0,172 R1)^r)$$

* Avec $r=1,0, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75$

* Le système utilisé pour ce test (les cellules HeLa rc-32) est supposé montrer la même résistance vis à vis des deux échantillons ($\kappa=450$).

- Etape 2 : Tracé du plot de Hill (figure 2A et 2B)

Le plot de Hill correspondant à $\log |P/(1-P)|$ en fonction du log de la dilution a été tracé, à partir des valeurs expérimentales, pour les deux échantillons [figures 2D (échantillon 1) et 2D' (échantillon 2)]. La régression linéaire obtenue montre que les données présentées dans la figure 1A répondent bien à l'équation de Hill.

- Etape 3 : Détermination de la concentration limite (titre τ) des préparations de vecteur (figure 1A)

τ est déterminé par la valeur maximale de R1 pour laquelle le coefficient de Hill (sur la courbe optimale de Hill) est égal à 1. Les valeurs τ des échantillons 1 et 2

ont été déterminées à partir des courbes de la figure 1A, les valeurs obtenues sont de 5,89 pour les deux échantillons.

- Etape 4 : Détermination de l'efficacité (ϵ) et de l'efficacité standardisée (ϵ/P_{max}) (figure 3)

5 L'efficacité est la pente de la courbe de Hill (ou de toute courbe sigmoïdale traduisant les valeurs obtenues) à son point d'inflexion.

ϵ a été calculée comme suit :

La courbe H' ($H'=\delta H/\delta R_1$), dérivée de H a été tracée.

La valeur maximale atteinte par la courbe correspondant à ϵ a été déterminée 10 pour les échantillons 1 et 2, les valeurs obtenues sont 0,808 et 0,906, respectivement (figure 3).

- Etape 5 : Détermination de l'homogénéité du système biologique (η), (figure 1B)

La courbe r en fonction de $\log dil$ a été tracée et le nombre de paliers 15 sur la courbe a été déterminé.

L'index d'hétérogénéité η a été déterminé comme suit, en fonction du nombre de paliers (un palier ; $\eta=1$, deux paliers ; $\eta=2$, x paliers ; $\eta=x$)

On obtient $\eta=1$; par conséquent le système biologique testé est homogène.

20 **- Etape 6 : Caractérisation complète du vecteur (figure 5)**

L'ensemble des valeurs obtenues pour chacun des paramètres suivants :

P_{max} , κ , r , ϵ , τ , π , η , ϵ/P_{max} , π/P_{max} et κ/P_{max} , permet de caractériser chaque préparation de vecteur.

25 **- Etape 7 : Classement des vecteurs en fonction de leur performance (figure 5)**

Les vecteurs ont été classés en fonction des valeurs obtenues pour :

P_{max} , κ , π , τ , π/P_{max} et κ/P_{max} .

b) Résultats

30 Les deux échantillons montrent des titres apparents équivalents ($\tau=5,89$) ; cependant les titres absolus sont différents $\theta_1/\theta_2=\pi_2/\pi_1=0,725$ et la

puissance de l'échantillon 2 ($\pi_1=0,172$) est supérieure à celle de l'échantillon 1 ($\pi_2=0,125$).

Cette valeur n'est pas compensée par la puissance corrigée π/P_{max} puisque l'on retrouve une valeur pour l'échantillon 2 ($\pi/P_{max}=0,07$) supérieure à celle de l'échantillon 1 ($\pi/P_{max}=0,06$).

En considérant que κ est constant, c'est-à-dire que les cellules HeLa rc-32 montrent la même résistance vis-à-vis des deux échantillons, l'échantillon 2 est légèrement plus efficace que l'échantillon 1 ($\varepsilon_2=0,906 > \varepsilon_1= 0,808$) et sa capacité maximale $P_{max}=2,35$ est supérieure à celle de l'échantillon 1 ($P_{max}=2,05$).

L'analyse des valeurs des différents paramètres de Hill obtenues pour les deux échantillons de vecteur recombinant permet de tirer les conclusions suivantes :

Les titres apparents de deux lots d'un même vecteur sont équivalents et correspondent à ce qui est généralement déterminé dans l'Art antérieur, alors que la détermination des paramètres de Hill et éventuellement des paramètres dérivés permet de mettre en évidence des différences dans leur puissance corrigée et leur efficacité. La caractérisation de deux lots d'un même vecteur viral, à l'aide des paramètres pertinents de Hill et éventuellement de ses paramètres dérivés permet donc bien de valider et d'optimiser des agents biologiques (préparations de vecteurs viraux par exemple) utilisables dans une application particulière (thérapie génique *in vivo*).

Exemple 2 : Système biologique présentant une hétérogénéité.

a) Définition du système biologique

L'agent biologique analysé est un vecteur rétroviral dénommé (pSI-EGFP ; Ropp et al., Cytometry, 1995, 21, 309-317), codant le gène rapporteur de la protéine fluorescente eucaryote (*Eukaryotic Green Fluorescent Protein* ou EGFP) et les cellules cibles sont les cellules HT-1080 (ATCC n° CCL-121).

Les cellules cibles ont été ensemencées à une concentration R2 et infectées avec les dilutions en série du vecteur. Au temps $t=48h$, l'intensité de fluorescence (produit P) représentant la quantité du gène rapporteur EGFP exprimée par le vecteur a été mesurée pour chaque dilution.

b) Détermination de la courbe de Hill optimale (figure 6A)

L'ensemble des points expérimentaux ne peut pas s'ajuster à une seule courbe de Hill. On observe deux sous-ensembles de points :

- les points situés dans la partie gauche de la figure 6A s'ajustent à 5 une courbe de Hill correspondant à $\kappa=8000$ (courbe supérieure),
 - les points situés dans la partie droite de la figure 6A s'ajustent à une courbe de Hill correspondant à $\kappa=3500$ (courbe inférieure).

c) Détermination de l'homogénéité du système biologique (n). (figure 6B)

La courbe r en fonction des n° de points, ordonnés selon les concentrations telles qu'elles apparaissent à la figure 6A, a été tracée et le nombre de paliers sur la pente de la courbe a été déterminé (figure 6B).

La courbe présente 2 paliers ; par conséquent le système biologique testé est hétérogène et présente un index d'hétérogénéité $\eta=2$.

Exemple 3 : Criblage d'une banque de plasmides d'expression de mutants du 15 gène *rep* de rAAV.**a) Matériel et Méthode****- Définition du système biologique**

L'ensemble d'agents biologiques modifiés est une banque de vecteurs d'expression de mutants du gène *rep de rAAV* et les cellules cibles sont une lignée d'encapsidation de rAAV (lignée HeLa rc-32). Les cellules ont été 20 ensemencées à une concentration constante R2 puis transfectées avec les dilutions en série des différents plasmides d'expression. Au temps $t = 48$ h, la quantité de virus produite (produit P) a été mesurée selon la technique de dot-blot, telle que décrite à l'exemple 1.

25 - Détermination des paramètres de Hill

Ces paramètres sont déterminés en suivant les étapes 1 à 7 telles que décrites à l'exemple 1 et l'étape finale de sélection du mutant le plus adapté à la production du virus recombinant est effectuée en fonction des valeurs de τ obtenues.

b) Résultats

30 Les courbes expérimentales $P = f(\log 1/dilution)$ sont présentées à la figure 7 et le titre apparent τ de chaque plasmide d'expression, déterminé à partir de la courbe théorique de Hill est le suivant :

- Plasmide n°1 (courbe (1)) : $\tau = 7,1$
- Plasmide n°2 (courbe (2)) : $\tau = 6,4$
- Plasmide n°3 (courbe (3)) : $\tau = 6$

Les résultats indiquent que le mutant du gène *rep* de rAAV contenu
5 dans le plasmide n°1 possède l'activité la plus élevée dans le système testé.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite
nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui
viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les
variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarte du
10 cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Procédé d'évaluation de la performance d'un ensemble d'agents biologiques complexes dans des cellules cibles vivantes, avec lesquelles lesdits agents biologiques interagissent, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

(a) la préparation, pour chaque agent biologique dudit ensemble, d'une gamme d'échantillons, obtenue par dilutions en série dudit agent biologique à une concentration R1,

10 (b) l'incubation de chaque échantillon de ladite gamme de dilutions obtenue en 1. avec lesdites cellules cibles à une concentration constante R2,

(c) la détermination du produit P de la réaction R1 + R2, à un instant t, dans chacun desdits échantillons,

15 (d) l'établissement d'une courbe théorique H à partir desdits points expérimentaux R1 et P, pour chaque agent biologique par approximation itérative de paramètres qui reflètent la réaction $R1+R2 \rightarrow P$, audit instant t, conformément à l'équation suivante :

$$P = P_{\max} (\pi R1)^r / (\kappa + (\pi R1)^r) \quad r=1, \dots, n \quad (2),$$

dans laquelle :

20 R1 représente la concentration en agent biologique dans un échantillon de la gamme,

P représente le produit de la réaction R1 + R2 à un instant t,

P_{\max} représente la capacité maximale de la réaction,

κ représente la résistance des cellules cibles vivantes à répondre audit agent biologique,

25 r représente un coefficient qui dépend de R1 et qui correspond au coefficient de Hill, et

π représente la puissance intrinsèque de l'agent biologique à induire une réponse dans les cellules cibles vivantes, et

30 (e) le tri des valeurs de κ et de π obtenues en (d), pour chaque agent biologique et le classement des agents biologiques en fonction desdites valeurs.

2°) Procédé de criblage d'un ensemble d'agents biologiques complexes modifiés (banque de mutants) dans des cellules cibles vivantes avec

lesquelles lesdits agents biologiques interagissent, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes (a) à (e) telles que définies à la revendication 1 et une étape (f) de sélection de l'agent biologique le plus adapté à l'application recherchée.

5 3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que ledit agent biologique est sélectionné dans le groupe constitué par les virus, les vecteurs viraux et non-viraux, les vaccins, les anticorps et les protéines recombinantes.

10 4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'à l'étape (c), la détermination de P est réalisée soit de manière directe, par exemple par dosage de P, soit de manière indirecte, par exemple, à l'aide d'un test biologique convenablement sélectionné pour la mesure d'au moins un paramètre ou une variable reflétant la réponse du système biologique audit agent biologique.

15 5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, la mesure d'au moins l'un des paramètres dérivés suivants :

- l'efficacité globale ϵ de la réaction induite par l'agent biologique sur ledit système,
- le titre apparent τ de l'agent biologique, correspondant à l'origine 20 de la courbe théorique H obtenue en (d),
- le titre absolu θ dudit agent biologique défini par l'équation $\theta \pi = \tau / s$ (3), dans laquelle s représente la sensibilité de la méthode de détection, et
- l'index d'hétérogénéité η de ladite réaction biologique.

25 6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la mesure du paramètre d'évaluation ϵ représentant l'efficacité spécifique d'un agent biologique apte à induire la production de P dans les cellules cibles vivantes est réalisée soit par mesure de la pente de la courbe théorique obtenue en (d) à son point d'inflexion, soit par calcul du maximum de la dérivée première et éventuellement de la dérivée seconde de la courbe théorique obtenue en (d).

30 7°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend en outre la mesure des paramètres suivants : π/P_{max} , κ/P_{max} ou ϵ/P_{max} .

8°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les valeurs des paramètres de Hill correspondant à chaque agent biologique sont comparées à celles obtenues avec un agent biologique de référence.

9°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que pour valider l'analyse de la réaction R1+R2 par l'équation de Hill, le procédé peut comprendre en outre une étape de traitement des données expérimentales obtenues à l'étape (d) (Hill plot), conformément à l'équation suivante :

$$\log |P/(1 - P)| \text{ vs. } \log R_1.$$

10 10°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend :

. la sélection des agents biologiques présentant des valeurs minimales acceptables pour les paramètres sélectionnés : π , κ , r , ϵ , θ , τ , η , π/P_{\max} , κ/P_{\max} ou ϵ/P_{\max} et

15 . l'analyse itérative des courbes H correspondant auxdits agents biologiques sélectionnés, conformément à l'équation (2), pour éliminer les valeurs élevées par compensation, suivie de

. l'élimination des agents biologiques qui compensent et pour lesquels des courbes alternatives peuvent être obtenues, pour la constitution d'une liste d'agents biologiques à action optimale.

20 11°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 10, caractérisé en ce que ledit ensemble d'agents biologiques modifiés est constitué par une banque de mutants, obtenue par l'introduction naturelle ou artificielle d'une ou plusieurs mutations dans la séquence nucléotidique et/ou peptidique desdits agents biologiques.

25 12°) Agent biologique modifié, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 11.

1/7

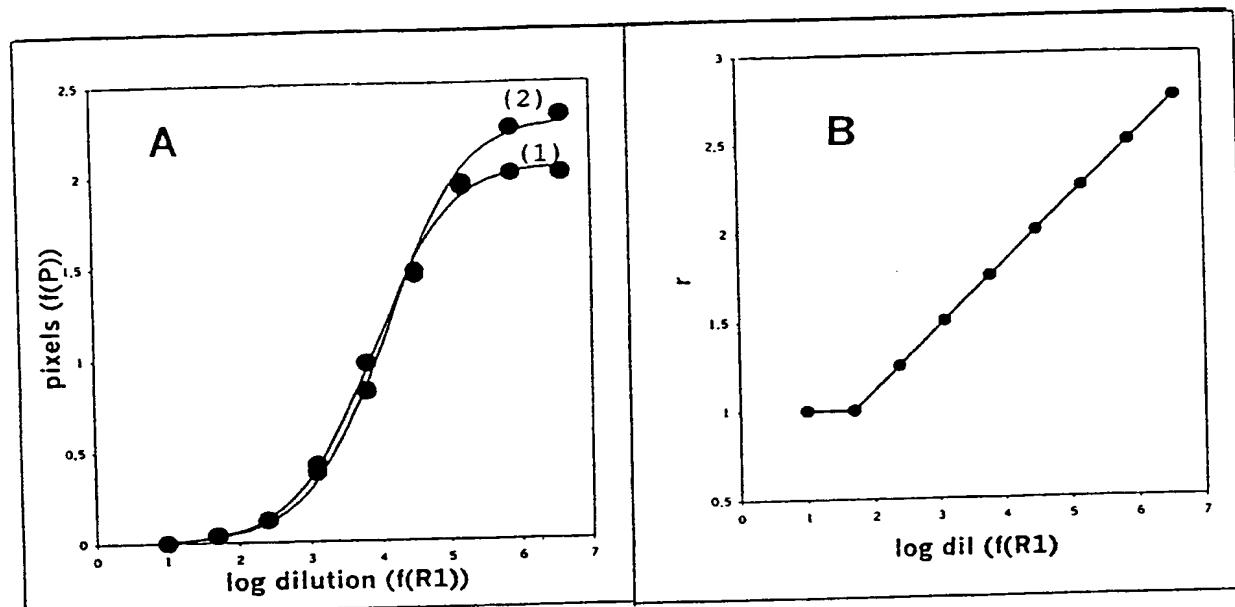


FIGURE 1

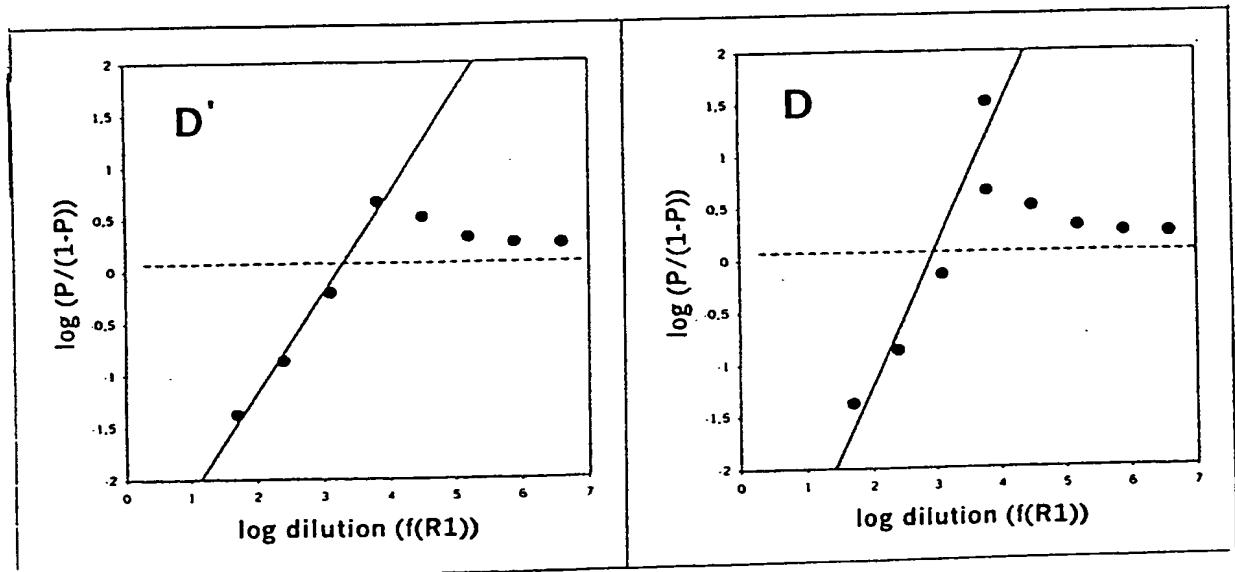


FIGURE 2

2/7

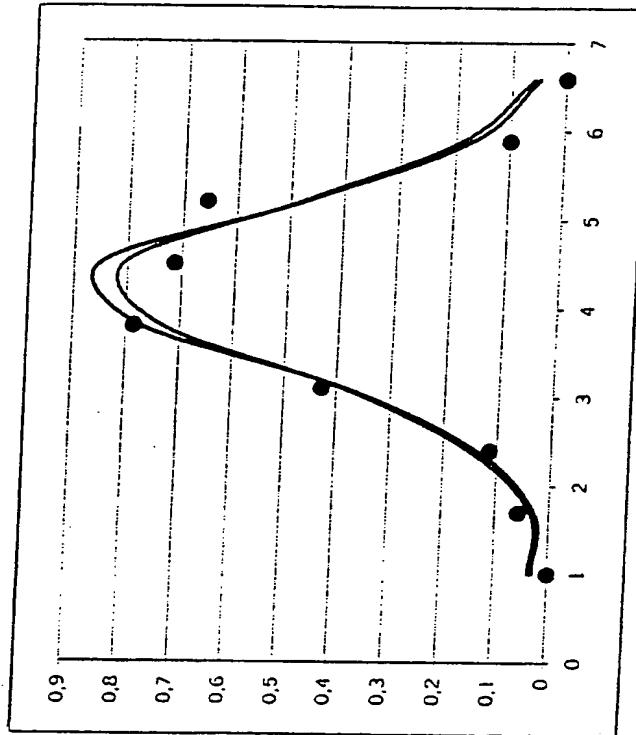


FIGURE 3

vol(f(R1))	log(dil)	P(1)	P(2)	H(1)	H(2)	n	H'(1)	H'(2)	Hill plot 1	Hill plot 2
0,1	1	0	0	0,0358	0,0281	1	0,0358	0,0281	0,0358	0,0358
0,02	1,6990	0,04	0,04	0,0601	0,0473	0,0601	0,0347	0,0274	0,0347	0,0347
0,004	2,3979	0,12	0,12	0,1679	0,1442	0,1679	1,25	0,1540	0,1385	0,1540
0,0008	3,0969	0,42	0,38	0,4409	0,4130	0,4409	1,5	0,3900	0,3840	0,3900
0,000016	3,7959	0,97	0,82	0,9555	0,9552	0,9555	1,75	0,7350	0,7746	0,7350
0,0000032	4,4949	1,47	1,45	1,5208	1,5522	1,5208	2	0,8075	0,8528	0,8075
0,00000064	5,1938	1,93	1,95	1,8591	1,8857	1,8591	2,25	0,4834	0,4764	0,4952
0,000000128	5,8928	2	2,25	1,9913	2,0038	1,9913	2,5	0,1888	0,1688	0,4834
0,000000256	6,5918	2	2,32	2,0332	2,0379	2,0332	2,75	0,0599	0,0487	0,3171
										0,3010
										0,2553
										0,2449

FIGURE 4

3/7

Echantillon 1 Echantillon 2

	Echantillon 1	Echantillon 2
P_{\max}	2,05	2,35
τ (log dil)	5,89	5,89
π	0,125	0,172
π/P_{\max}	0,06	0,07
κ	450	450
κ/P_{\max}	219,5	191,5
ε	0,808	0,906
ε/P_{\max}	0,394	0,385
η	1	1
r	1,0, 1,0, 1,25 1,5, 1,75, 2,0 2,25, 2,5, 2,75	1,0, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75
$\Delta r / \Delta (\log \text{dil}) = \text{cte.}$	0,313	0,313

FIGURE 5

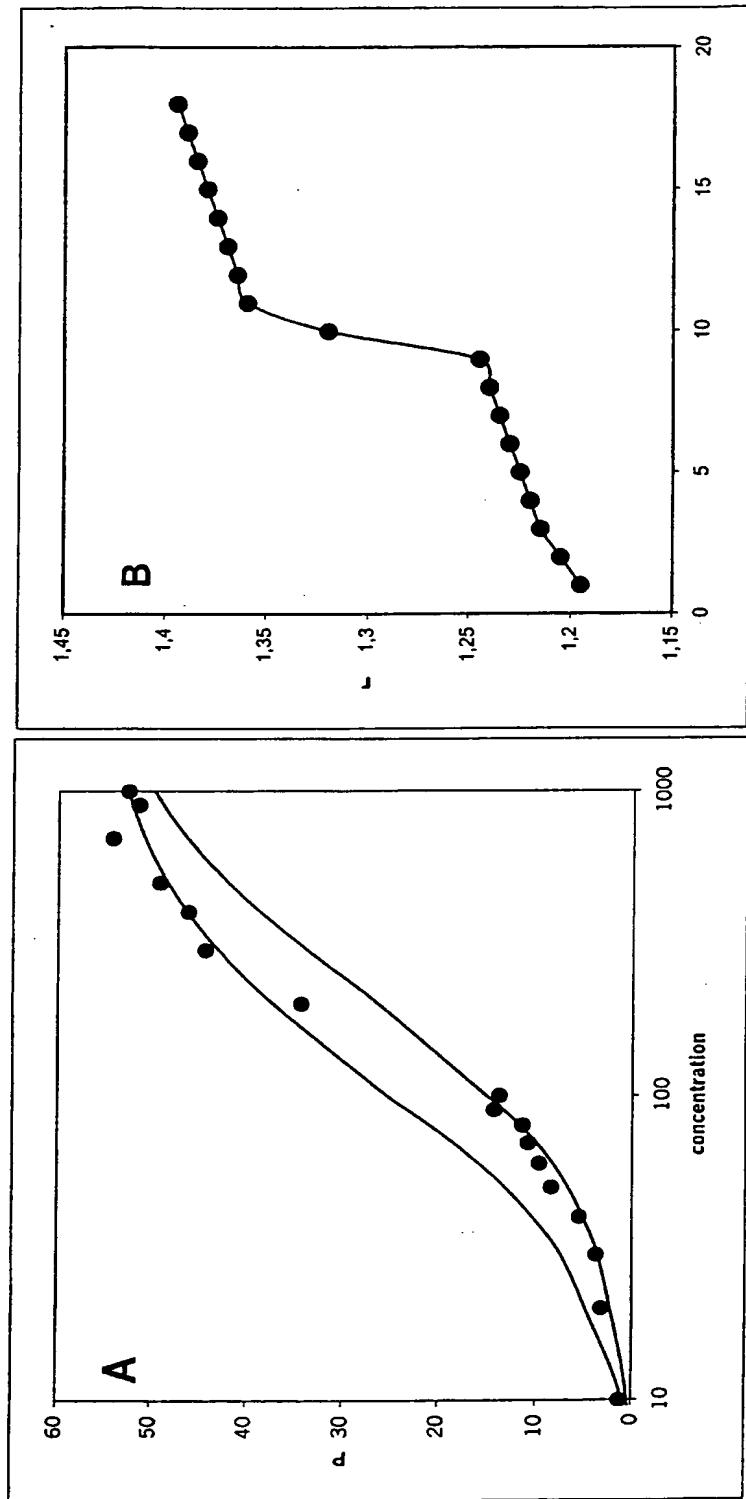


FIGURE 6

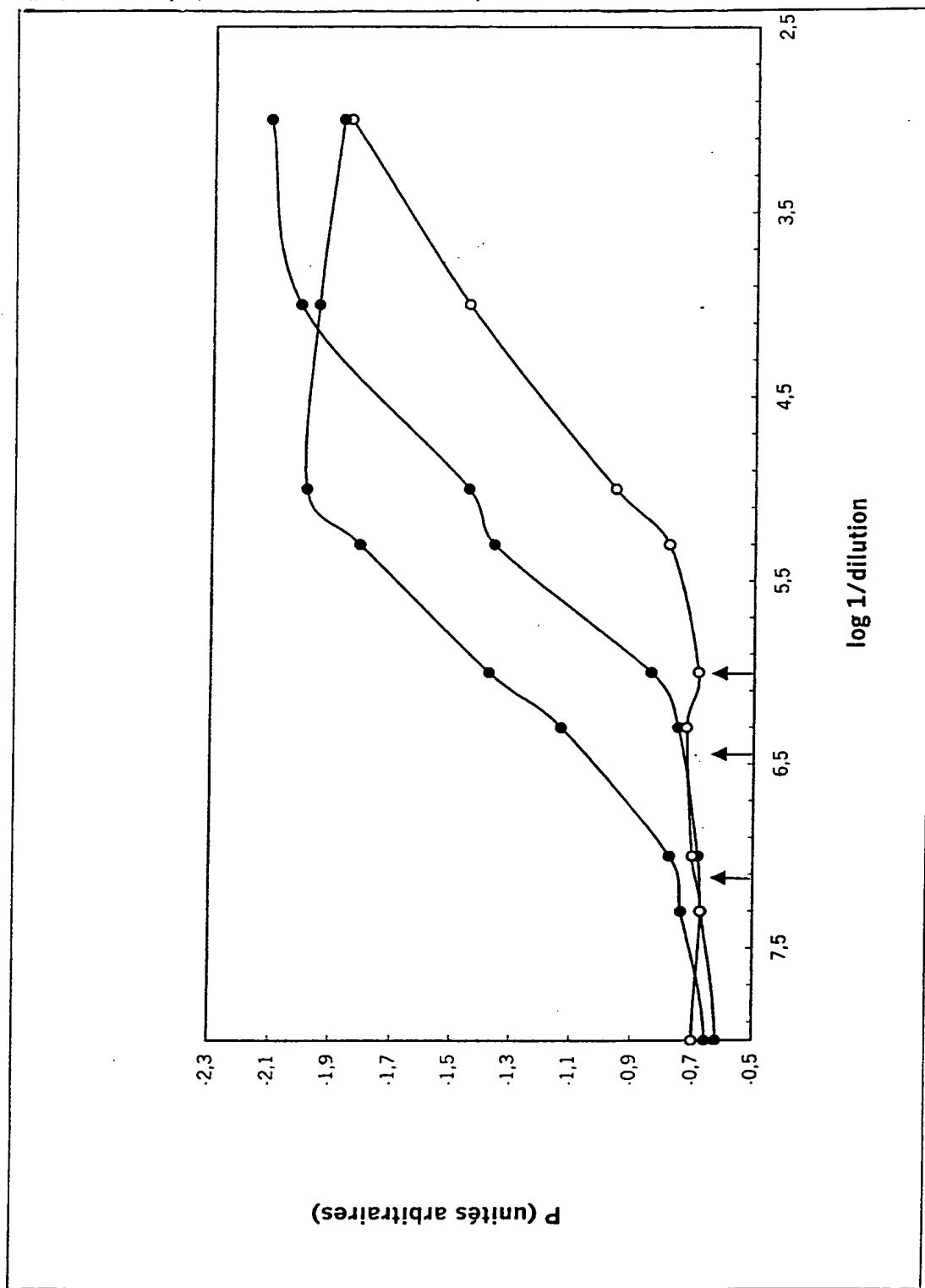
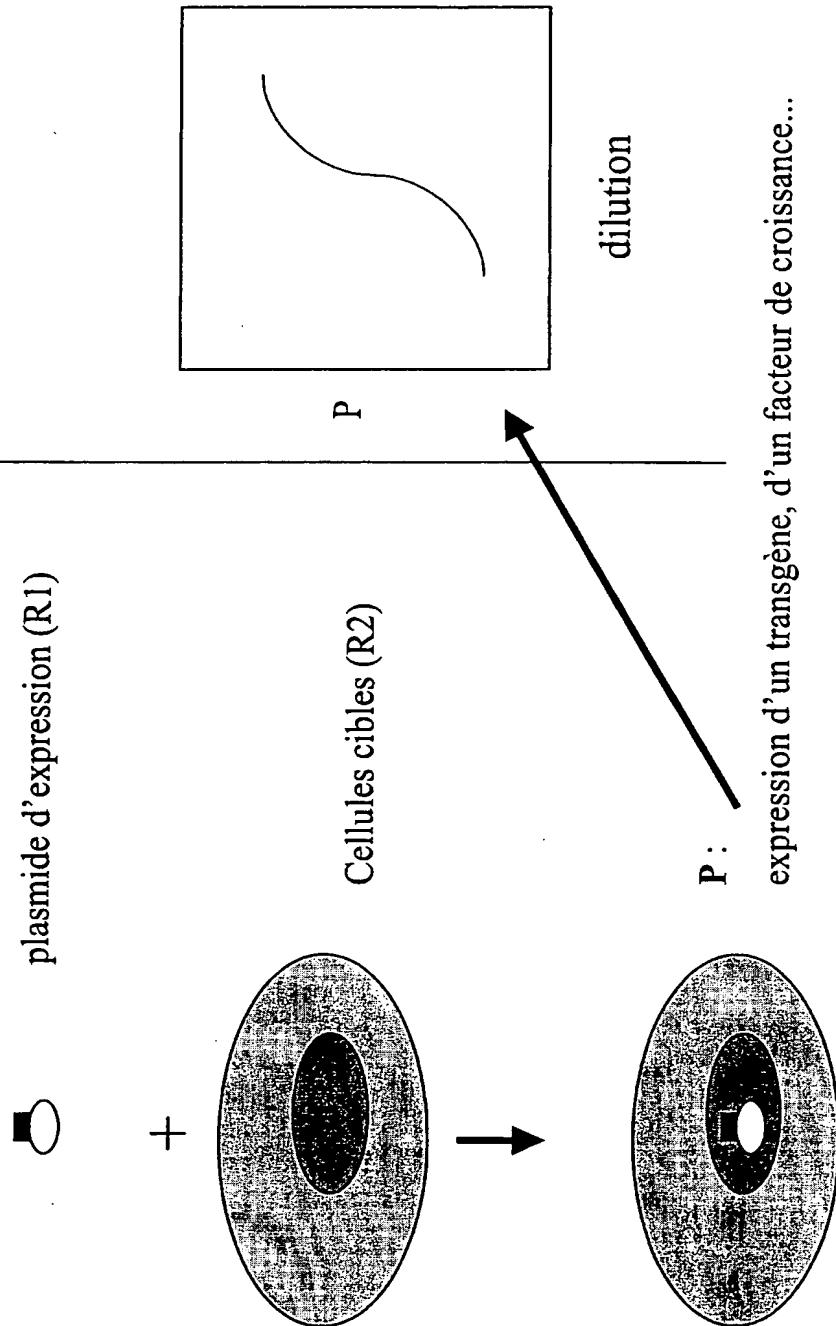


FIGURE 7

Figure 8



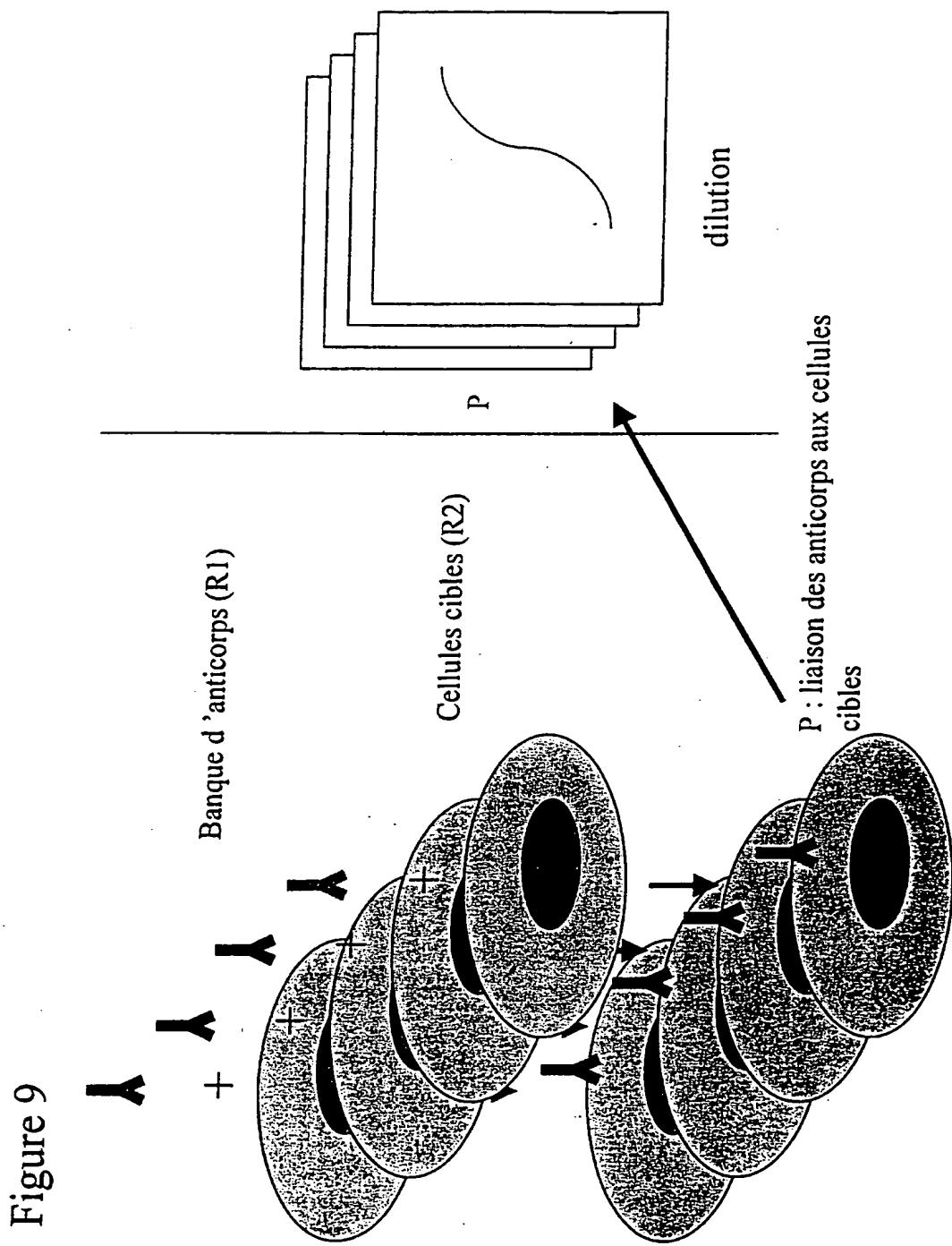


Figure 9

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 juin 2001 (21.06.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/44809 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ : G01N 33/50, C12Q 1/68, C12N 7/02

(21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR00/03503

(22) Date de dépôt international : 13 décembre 2000 (13.12.2000)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
99/15884 16 décembre 1999 (16.12.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : NAUTILUS BIOTECH [FR/FR]; Pépinière Génopole Industries, 4, rue Pierre Fontaine, F-91000 Evry Cedex (FR).

(72) Inventeur; et
(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : VEGA, Manuel [IT/FR]; 49, rue Félix Faure, F-91270 Vigneux-sur-Seine (FR).

(74) Mandataire : CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : JP, US.

(84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

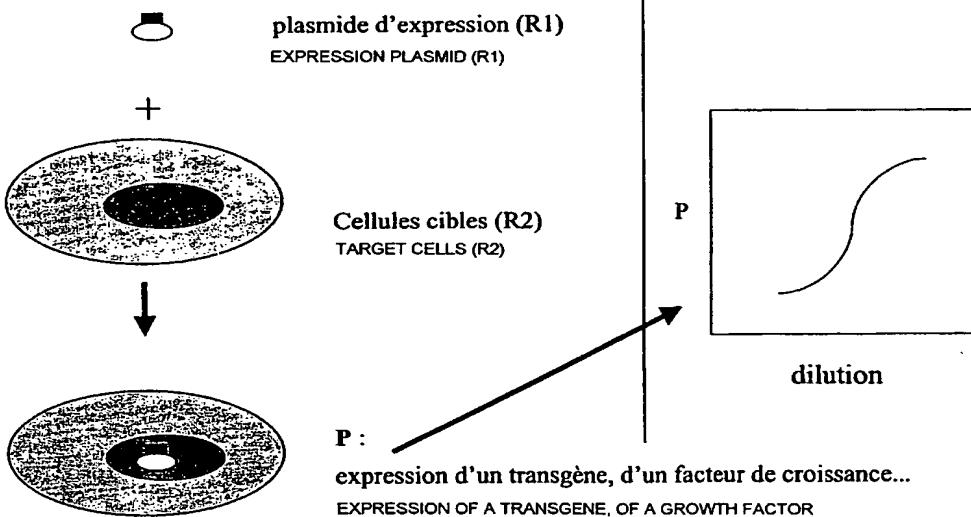
Publiée :
— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 20 décembre 2001

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: EVALUATION OF BIOLOGICAL AGENTS IN LIVING TARGET CELLS

(54) Titre : EVALUATION D'AGENTS BIOLOGIQUES DANS DES CELLULES CIBLES VIVANTES



WO 01/44809 A3

(57) Abstract: The invention concerns a method for screening and/or evaluating the performance of a set of biological agents, such as a library of recombinant viral or non-viral vectors, of recombinant proteins or antibodies in living target cells (complex biological system).

[Suite sur la page suivante]

WO 01/44809 A3



En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé : Méthode de criblage et/ou d'évaluation de la performance d'un ensemble d'agents biologiques, tel qu'une banque de vecteurs viraux ou non viraux recombinants, de protéines recombinantes ou d'anticorps, dans des cellules cibles vivantes (système biologique complexe).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/03503

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/50 C12Q1/68 C12N7/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHARBORD P; NEEL H; LEHN P; PARMENTIER C: "NORMAL HUMAN GRANULO MONOCYTIC BONE MARROW PROGENITOR CELLS RESPONSIVENESS TO COLONY STIMULATING ACTIVITY" NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol. 22, 1980, pages 357-370, XP000949859 page 363; figure 3 ---	1-11
A	SCHUHMAN KLAUS; ROMANIN CHRISTOPH; BAUMGARTNER WERNER; GROSCHNER KLAUS: "Intracellular Ca ²⁺ inhibits smooth muscle L-type Ca ²⁺ channels by activation of protein phosphatase type 2B and by direct interaction with the channel" JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY, vol. 110, November 1997 (1997-11), pages 503-513, XP000949861 abstract --- -/-	1-11

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

11 July 2001

20/07/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No	
PCT/FR 00/03503	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOULLIER P; DAVELOOSE D; LETERRIER F; HOEBEKE J: "COMPARATIVE BINDING OF WHEAT GERM AGGLUTININ AND ITS SUCCINYLATED FORM ON LYMPHOCYTES" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 161, 1986, pages 197-204, XP000951462 page 199; figure 4 ---	1-11
A	ATKINSON E M ET AL: "A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 26, no. 11, 1 June 1998 (1998-06-01), pages 2821-2823, XP002099502 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document ---	1-3
A	NELSON DAVID M; WAHLFORS J JARMO; CHEN LIN; ONODERA MASAFUMI; MORGAN RICHARD A: "Characterization of diverse viral vector preparations, using a simple and rapid whole-virion dot-blot method" HUMAN GENE THERAPY, vol. 9, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 2401-2405, XP000951429 cited in the application the whole document ---	1-3
A	MITTEREIDER NANETTE; MARCH KEITH L; TRAPNELL BRUCE C: "Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 11, November 1996 (1996-11), pages 7498-7509, XP002148995 cited in the application the whole document ---	1-3
A	SALVETTI A ET AL: "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production" HUMAN GENE THERAPY, XX, XX, vol. 9, no. 5, 20 March 1998 (1998-03-20), pages 695-706, XP002097712 ISSN: 1043-0342 cited in the application page 697, column 2, paragraph 2 -page 699, column 1, paragraph 1 ---	1-3
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/03503

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAVIS A R ET AL: "HIGH THROUGHPUT METHOD FOR CREATING AND SCREENING RECOMBINANT ADENOVIRUSES" GENE THERAPY, GB, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, vol. 5, no. 8, August 1998 (1998-08), pages 1148-1152, XP000867556 ISSN: 0969-7128 cited in the application the whole document -----	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 00/03503

Continuation of Box I.2**Claim no.: 12**

Claim 12 of the present application concerns a "modified biological agent", solely defined by the fact that it is "obtainable by the method as per Claim 11", said method involving a bank of mutants, the evaluation of the performance of an agent introduced in target cells being assessed as per Claims 2 to 10.

No technical characteristic is mentioned in Claim 12, for example a chemical structure element, which would enable a meaningful search. Claim 12 does not provide any means to distinguish the substances forming part of prior art from the novel substances. No definition of the subject matter for which protection could be legitimately claimed can therefore be deduced from Claim 12 (PCT Article 6) or from the description (PCT Article 5).

Notwithstanding the reasons mentioned above, Claim 12 is also lacking in clarity (PCT Article 6). Indeed, there has been an attempt to define an agent by means of the result of a method which is not a production method but an identification method, which requires considerable effort on the part of a person skilled in the art to determine what is covered by said claim. It is not possible for the latter, without experimental research going beyond a routine test, to know if a given agent would be "obtainable by the method as per Claim 11". A fortiori, at the level of purely documentary research, the International Searching Authority cannot determine which agents would meet with what is claimed in Claim 12. In the present case, the lack of clarity is such that it is not possible to carry out a meaningful search on the whole spectrum covered by the claims.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, concerning inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the line of conduct adopted by the EPO acting in its capacity as International Preliminary Examining Authority is not to proceed with a preliminary examination of a subject matter in respect of which no search has been carried out. That attitude will remain unchanged, notwithstanding whether or not the claims have been modified, either after the report has been received, or during any procedure under Chapter II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

nande Internationale No PCT/FR 00/03503

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N33/50 C12Q1/68 C12N7/02		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHARBORD P; NEEL H; LEHN P; PARMENTIER C: "NORMAL HUMAN GRANULO MONOCYTIC BONE MARROW PROGENITOR CELLS RESPONSIVENESS TO COLONY STIMULATING ACTIVITY" NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol. 22, 1980, pages 357-370, XP000949859 page 363; figure 3 ---	1-11
A	SCHUHMAN KLAUS; ROMANIN CHRISTOPH; BAUMGARTNER WERNER; GROSCHNER KLAUS: "Intracellular Ca ²⁺ inhibits smooth muscle L-type Ca ²⁺ channels by activation of protein phosphatase type 2B and by direct interaction with the channel" JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY, vol. 110, novembre 1997 (1997-11), pages 503-513, XP000949861 abrégé ---	1-11
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités: 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier '&' document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 11 juillet 2001		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 20/07/2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Hart-Davis, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 00/03503

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MOULLIER P; DAVELOOSE D; LETERRIER F; HOEBEKE J: "COMPARATIVE BINDING OF WHEAT GERM AGGLUTININ AND ITS SUCCINYLATED FORM ON LYMPHOCYTES" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 161, 1986, pages 197-204, XP000951462 page 199; figure 4 ---	1-11
A	ATKINSON E M ET AL: "A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 26, no. 11, 1 juin 1998 (1998-06-01), pages 2821-2823, XP002099502 ISSN: 0305-1048 cité dans la demande le document en entier ---	1-3
A	NELSON DAVID M; WAHLFORS J JARMO; CHEN LIN; ONODERA MASAFUMI; MORGAN RICHARD A: "Characterization of diverse viral vector preparations, using a simple and rapid whole-virion dot-blot method" HUMAN GENE THERAPY, vol. 9, 1 novembre 1998 (1998-11-01), pages 2401-2405, XP000951429 cité dans la demande le document en entier ---	1-3
A	MITTERREDER NANETTE; MARCH KEITH L; TRAPNELL BRUCE C: "Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 11, novembre 1996 (1996-11), pages 7498-7509, XP002148995 cité dans la demande le document en entier ---	1-3
A	SALVETTI A ET AL: "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production" HUMAN GENE THERAPY, XX, XX, vol. 9, no. 5, 20 mars 1998 (1998-03-20), pages 695-706, XP002097712 ISSN: 1043-0342 cité dans la demande page 697, colonne 2, alinéa 2 -page 699, colonne 1, alinéa 1 ---	1-3
	-/-	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No PCT/FR 00/03503

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DAVIS A R ET AL: "HIGH THROUGHPUT METHOD FOR CREATING AND SCREENING RECOMBINANT ADENOVIRUSES"</p> <p>GENE THERAPY, GB, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE,</p> <p>vol. 5, no. 8, août 1998 (1998-08), pages 1148-1152, XP000867556</p> <p>ISSN: 0969-7128</p> <p>cité dans la demande</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p>	1-3

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/MSA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 12

La revendication 12 présente a trait à un "agent biologique modifié", défini uniquement par le fait qu'il est "susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 11", ledit procédé mettant en jeu une banque de mutants, l'évaluation de la performance d'un agent introduit dans des cellules cibles étant évaluée selon les revendications 2 à 10.

Aucune caractéristique technique n'est présente dans la revendication 12, par exemple un élément de structure chimique, qui permettrait que l'on effectue une recherche significative. La revendication 12 ne fournit aucun moyen de distinguer des substances faisant partie de l'état de la technique des substances nouvelles. Aucune définition de la matière pour laquelle une protection pourrait être légitimement revendiquée ne peut donc être déduite de la revendication 12 (Article 6 PCT) ou de la description (Article 5 PCT).

Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, la revendication 12 manque aussi de clarté (Article 6 PCT). En effet, on a cherché à définir un agent au moyen du résultat d'un procédé non pas de fabrication mais d'identification, qui exige un effort considérable de la part de l'homme du métier afin de déterminer ce qui est couvert par cette revendication. Il n'est pas possible pour ce dernier, sans recherches expérimentales allant au-delà d'un essai de routine, de savoir si un agent donné serait "susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 11". A fortiori, au stade de recherche purement documentaire, l'administration chargée de la recherche internationale ne peut déterminer quels agents satisferaient à la revendication 12. Le manque de clarté est tel, dans le cas présent, qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.